

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОННОЙ СИЛЫ РАСТВОРА НА ПЛАВЛЕНИЕ ДНК

Галюк Е.Н.

кандидат химических наук, ведущий лаборант кафедры биоорганической химии
учреждения образования «Белорусский государственный университет»,

г. Минск, Беларусь

elenagalyuk5@gmail.com

Ринейская О.Н.

кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биоорганической
химии учреждения образования «Белорусский государственный университет»,

г. Минск, Беларусь

ryneiskaya@mail.ru

Аннотация. В данной статье исследуется влияние ионной силы раствора на особенности плавления ДНК и изменение тонкой структуры кривых плавления с помощью разработанного ранее метода математической обработки дифференциальных кривых плавления ДНК.

Ключевые слова: ДНК; дифференциальные кривые плавления; математическое моделирование; тонкая структура; ионная сила раствора

MATHEMATICAL PROCESSING OF THE SOLUTION IONIC STRENGTH INFLUENCE ON DNA MELTING

Galyuk E.N.

Candidate of Chemistry, leading laboratory assistant of the Department of
Bioorganic Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State University",

Minsk, Belarus

elenagalyuk5@gmail.com

Ryneiskaya O.N.

Candidate of Medical sciences, Associated Professor, the Head of the Department of
Bioorganic Chemistry of the Educational Institution "Belarusian State University",

Minsk, Belarus

ryneiskaya@mail.ru

Annotation. The article deals with investigation of ionic strength influence on DNA melting and changes of fine structure of melting curves by using of previously developed mathematical processing of DNAs differential melting curves.

Key words: DNA; differential melting curves; mathematical processing; fine structure; ionic strength

Многие лекарственные средства осуществляют свое биологическое действие путем сильного координационного или электростатического связывания с ДНК. Примерами могут служить противоопухолевые соединения платины, такие как цисплатин, карбоплатин и олигоплатин, образующие ковалентные связи с ДНК. Поэтому важно понимать воздействие внешних условий, в частности, состава среды, при связывании таких соединений с ДНК. Для этих целей используют плавление ДНК при различных ионных силах.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) широко используется для исследования как нативной ДНК, так и ее комплексов с различными соединениями. В результате его использования получают термограмму - дифференциальную кривую плавления (ДКП), температурную зависимость дополнительной мощности нагревателя ячейки с образцом относительно нагревателя ячейки сравнения с растворителем. На термограмме ДНК выявляется широкий основной пик и следующие за ним 4 пика тонкой структуры, соответствующей плавлению сателлитных ДНК, которые в основном находятся в центромерах хромосом [1]. Нами был разработан метод первичной математической обработки ДСК кривых, позволяющий четко выявлять особенности тонкой структуры ДКП [2]. Для этого использовалась вторая производная ДКП с последующим ее сглаживанием путем аппроксимации p последовательных точек полиномом степени n , используя метод наименьших квадратов, и смещения центральной точки. Изменяя степень полинома, число точек, по которым проводится сглаживание, число повторных сглаживаний, можно варьировать степень сглаживания. Чем сильнее сглаживание, тем больше вероятность избавиться от высокочастотных шумов. Однако при слишком сильном сглаживании происходит искажение полезного сигнала [2].

С помощью этого метода мы исследовали влияние ионной силы раствора на характер плавления ДНК.

Материалы и методы. В данной работе использовали ДНК из тимуса теленка (Sigma-Aldrich). Дифференциальные кривые плавления ДНК получали с помощью сканирующего нано-калориметра CSC 6300 (Nano-Differential Scanning Calorimeter III (model CSC 6300)). Плавление ДНК проводили в растворах, содержащих NaCl, 0,001M Na₂CO₃, 0,01M NaClO₄, 5·10⁻⁵M EDTA при общей концентрации ионов натрия, равной 0,01, 0,03, 0,06, 0,11 и 0,21M, pH ~7. Концентрация ДНК составляла 0,7 мг/мл. Переход спираль-клубок ДНК вызывает появление пика в области 63-90°C.

На рисунке 1А представлены термограммы и их отрицательные вторые производные для ДНК из тимуса теленка, зарегистрированные при различных концентрациях ионов Na⁺ от 0,01 до 0,21 M. Из рисунка видно, что при увеличении [Na⁺] термостабильность ДНК растет. Кроме того, при снижении

ионной силы ухудшается разрешение тонкой структуры кривой плавления ДНК. В целом изменение формы (тонкой структуры) калориметрических кривых гораздо лучше видно на кривых отрицательных вторых производных (рисунок 1В). Четыре пика, соответствующих сателлитным ДНК, разрешены гораздо лучше, и хорошо видна специфика их изменения при уменьшении ионной силы раствора.

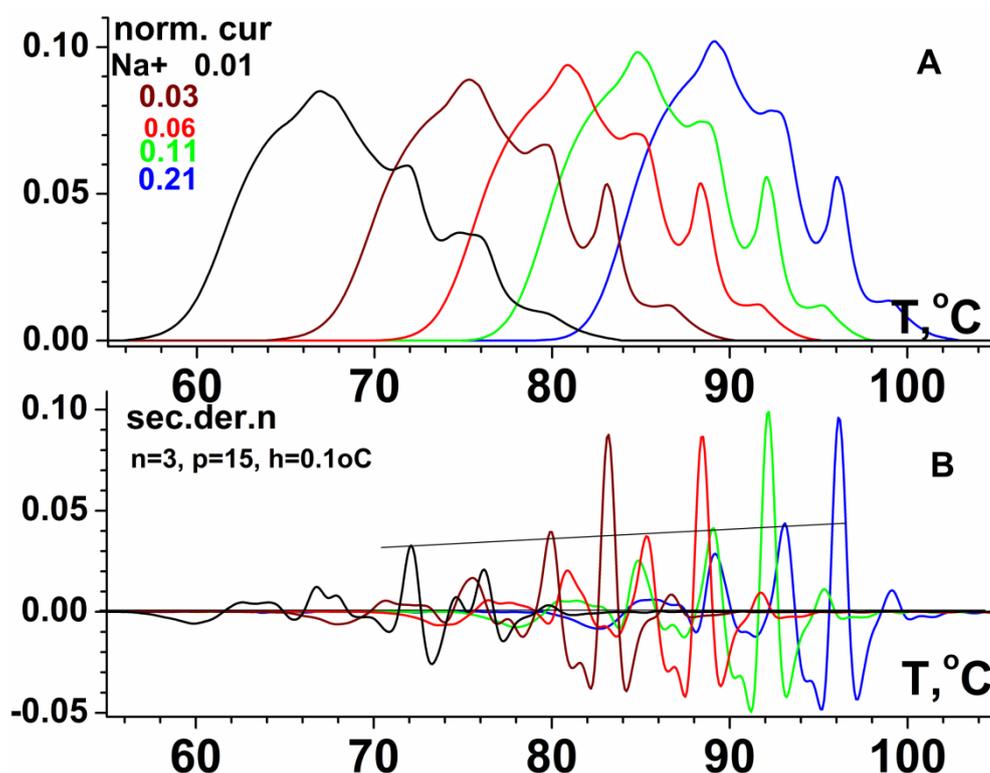


Рисунок 1 - Калориметрические кривые (А) и их отрицательные вторые производные (В) для ДНК из тимуса теленка, полученные при различных ионных силах, указанных на рисунке

Чтобы изучить относительное изменение положения пиков и их формы, следует сдвинуть кривые таким образом, чтобы один из четырех пиков совпадал по положению. Рисунок 1В позволяет выбрать такой пик. На кривых отрицательной второй производной пик 3 является самым высоким. Однако он не подходит в качестве пика совмещения, поскольку при снижении $[Na^+]$ от 0,03 до 0,01 М происходит резкое изменение его формы, вызванное его разделением на 2 составляющие. Вторым по высоте пик 2 является более устойчивым по форме к изменению ионной силы раствора. Поэтому он подходит для совмещения всех кривых по его положению. За точку совмещения примем положение пика 2 (T_{max2}) при концентрации ионов Na^+ , равной 0,01 М.

На рисунке 2 представлены смещенные кривые отрицательной второй производной. Становятся очевидными изменения отдельных пиков и формы кривой плавления в целом. При снижении ионной силы все пики становятся ниже. Однако резкое уменьшение амплитуды и изменение формы некоторых из них происходит при изменении концентрации Na^+ от 0,03 до 0,01 М: Пики 1 и 3 раздваиваются, а пик 4 резко уменьшает амплитуду. Полный интервал плавления возрастает примерно на 4°C при изменении $[\text{Na}^+]$ от 0,21 до 0,01 М. Ширина температурного интервала плавления (ΔT), измеренная как удвоенная разность температур $T_{0.75} - T_{0.25}$, соответствующих степеням денатурации ϑ , равным 0,75 и 0,25, равна 11,4 и 13,8°C при 0,21 М и при 0,01 М. Две максимально удаленные характерные точки на кривой второй отрицательной производной - это первый (низкотемпературный) минимум и пик 4. Расстояние между ними при 0,21 М и при 0,01 М соответственно равно 16,48 и 20,0°C.

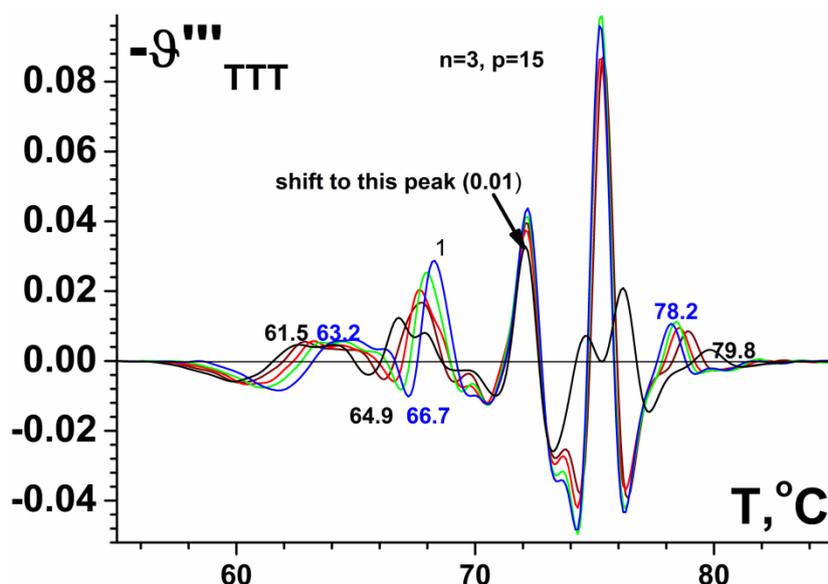


Рисунок 2 - Кривые, представленные на рисунке 1В, после их смещения по температурной шкале на величину, указанную в Таблице 1. $n=3, p=15$

Таблица 1 - Исходное положение пика 2 и величина смещения его отрицательных вторых производных при различных режимах сглаживания

$[\text{Na}^+]$, М	0,01	0,03	0,06	0,11	0,21
$T_{\text{max}2}$ ($n=3, p=15$)	72,11	79,94	85,33	89,09	93,10
Температурный сдвиг, °С	0	-7,83	-13,22	-16,98	-20,89
$T_{\text{max}2}$	71,92	79,81	85,15	88,88	92,90

(n=3, p=31)					
Температурный сдвиг, °С	0	-7,89	-13,23	-16,96	-20,98
$T_{\max 2}$ (n=3, p=21)	71,90	79,76	85,08	88,78	92,86
Температурный сдвиг, °С	0	-7,86	-13,18	-16,88	-20,96

На рисунке 3 представлены результаты расчета вторых отрицательных производных при более сильном режиме сглаживания ($n=2, p=21$). Исчезают многие детали, проявляющиеся при слабом сглаживании. Поэтому эффекты ионной силы проявляются более простым образом. Вместе с тем, как следует из таблицы 1, усиление сглаживания не искажает положений пиков и других характерных точек. Однако, как следует из сравнения рисунков 2 и 3, этот режим ($n=2, p=21$) имеет недостаток. Он немного уменьшает значение минимума и максимума в части кривой, соответствующей главному пику.

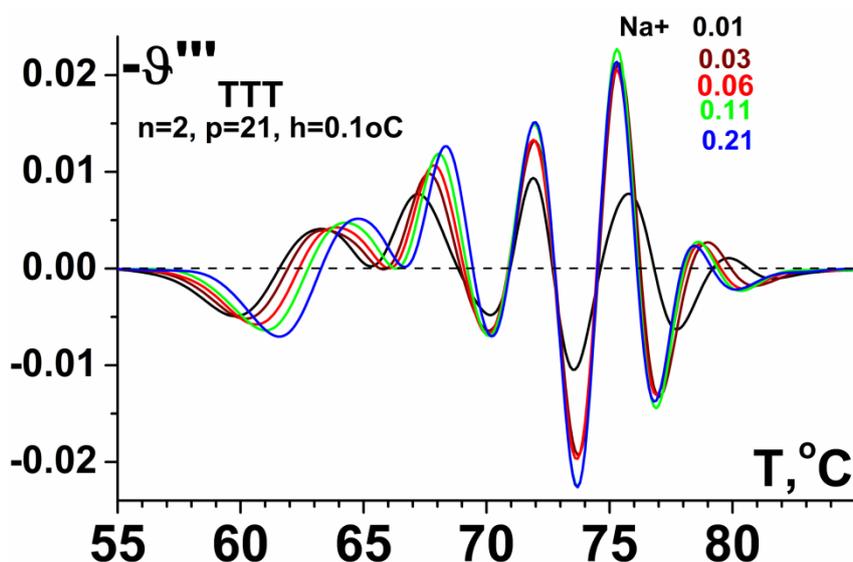


Рисунок 3 - Кривые смещенных отрицательных вторых производных, представленные на рисунке 2, при более сильном сглаживании ($n=2, p=21$)

Таким образом, проведенное исследование позволяет избирательно выявить изменения, затрагивающие различные участки ДНК. Это актуально при изучении механизмов связывания ДНК с противоопухолевыми соединениями платины. Наши исследования показали, что в ходе взаимодействия ДНК с цисплатином наблюдается исчезновение спутниковых пиков [1].

Список литературы

1. Lando, D.Y. Cisplatin and transplatin selectively destroy melting peaks of centromeric DNA / D.Y. Lando, Chun-Ling Chang, A.S. Fridman, E. Süleymanoğlu, E.N. Galyuk, Chin-Kun Hu //Международная научная конференция “Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем” и XI съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: сб. статей. - Мн., 2014. - С. 169-171.

2. Галюк, Е.Н. Первичная математическая обработка кривых плавления комплексов ДНК с противоопухолевым препаратом цисплатин и его неактивным аналогом трансплатином, полученных методом дифференциальной сканирующей калориметрии / Е.Н. Галюк, О.Н. Ринейская // Сб. материалов Международной научной конференции «Современные проблемы медицинской биохимии». – БГМУ. -25.01.2022. – Минск, Беларусь. – С. 50-55.